

ELECTROPORATION

Patent Number: JP62228277
Publication date: 1987-10-07
Inventor(s): OKADA KAZUYA; others: 02
Applicant(s): KIRIN BREWERY CO LTD
Requested Patent: ☐ JP62228277
Application Number: JP19860069080 19860327
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/00; C12N13/00
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To efficiently obtain plant protoplasts containing exogenotes, by reducing impulses by electric pulses, mainly using KCl as an electrolyte in a buffer solution and subjecting the plate protoplasts to electroporation.

CONSTITUTION:Plant protoplasts in a state dispersed in an isotonic buffer solution together with a genetic substance are subjected to electroporation in which electric pulses are applied through a condenser under condition of 250-2,500V voltage of the electric pulses based on 1cm distance between electrodes for applying the pulses, 0.4-300 μ F condenser capacity based on 1cm² area of the electrodes for applying the pulses and KCl as a main electrolyte contained in 15-210mM concentration to introduce the above-mentioned genetic substance into the above-mentioned plant protoplasts and afford the aimed modified protoplasts in high yield.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-228277

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)10月7日

C 12 N 15/00

7115-4B

13/00

7133-4B

//(C 12 N 15/00

C 12 R 1:91)

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 エレクトロポレーション

⑯ 特 願 昭61-69080

⑰ 出 願 昭61(1986)3月27日

⑱ 発 明 者 岡 田 和 也 名古屋市千種区松竹町2丁目55 青山方

⑲ 発 明 者 長 田 敏 行 岡崎市江口3丁目7番地10号 キングスコート江口201号

⑳ 発 明 者 建 部 到 愛知県愛知郡日進町折戸藤塚56-1313

㉑ 出 願 人 麒麟麦酒株式会社 東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

㉒ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

エレクトロポレーション

2. 特許請求の範囲

1. 植物プロトプラストを遺伝物質と共に等張緩衝液中に分散した状態においてコンデンサーを介して電気パルスを加することからなるエレクトロポレーションに付すことによって該遺伝物質を該植物プロトプラスト中に導入する方法において、このエレクトロポレーションを下記の条件下に行なうことを特徴とする、エレクトロポレーションによる植物プロトプラストの遺伝物質の導入法。

(イ) 電気パルスの電圧が、パルス印加用電極間の距離1cmにつき250～2500Vであること。

(ロ) コンデンサー容量が、パルス印加用電極の面積1cmにつき0.4～300μFであるこ

と。

(ハ) 緩衝液が主要電解質としてKClを15～210mMで濃度で含むものであること。

2. 電圧が500～1200V/cmである、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. コンデンサー容量が20～60μF/cmである、特許請求の範囲第1～2項のいずれか1項記載の方法。

4. 遺伝物質が、RNA、DNAおよび植物ウイルス粒子からなる群から選ばれる、特許請求の範囲第1～3項のいずれか1項記載の方法。

5. KCl濃度が20～180mMである、特許請求の範囲第1～4項のいずれか1項記載の方法。

6. 緩衝液のpHが5～8である、特許請求の範囲第1～5項のいずれか1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(発明の背景)

技術分野

本発明は、エレクトロポレーション技術に関する。さらに具体的には、本発明は、エレクトロポレーションによって植物プロトプラスト中に外来遺伝子を導入する方法の改良に関する。換言すれば、本発明は、外来遺伝物質を包有する植物プロトプラストの製造法に関する。

植物細胞中にRNA分子を導入することは、細胞内でのmRNAの機能を研究するための有用な手段である。このことは、自己増殖能を持つmRNA、たとえばプラス鎖RNAウイルスのゲノムRNA、の型合に特にいえることである。また、DNA分子を植物細胞中に導入することは、植物細胞中で発現しうる遺伝子の検出または遺伝子の機能に関する研究、ひいては植物細胞の形質転換および分子的側面からの改良に有用な手段である。

そして、上記のような理学的な観点に加えて、

ものであるという点で、有意義なものである。しかしながら、従来慣用されている直接導入法は、必ずしも満足すべきものではなかった。すなわち、植物細胞はそれをプロトプラストの形にしても外来遺伝子の導入が不十分であるので、導入促進剤としてポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリカチオンポリマー等の合成高分子を使用することが必要であるが、そのような手段を講じてもおおむね導入効率が低く、また使用する合成高分子のプロトプラストへの副作用があること、等の問題があったからである。さらに、直接導入法の他の例としてマイクロインジェクション法があるが、この方法にも扱える細胞数が少ないという問題があった。

最近に至って、このような薬品処理によらないで物理的手段で遺伝物質を導入する直接導入法、すなわち電気パルスによる方法、が開発された。

この電気パルスによる方法は、プロトプラストに電気パルスを印加することによって、すなわち高い電圧を短時間印加することによって、プロト

プラスト表面に一時的に小孔(ポア)を開けて、そこから遺伝物質を導入することからなるものであって、エレクトロポレーションと呼ばれている。電気パルスの印加が装置的にも方法的にも簡便であるので、エレクトロポレーションは工業的簡便導入法としては大いに興味のあるものである。

先行技術

植物細胞中に外来遺伝子を導入する方法には、現在のところ二種類が知られている。すなわち、アグロバクテリウムを仲介としてTiプラスミド(またはその一部)を外来遺伝子用ベクターとして使用する、および植物プロトプラストへ外来遺伝子を直接導入する方法、である。

これらの二種類の方法のうち、前者は、外来遺伝子導入という目的に対して間接的な手段であるという生得の問題点の外に、特に単子葉植物への遺伝子導入が一部のものではできないことならびに遺伝子をTiプラスミド上の特定の部分に導入するまでの手順が複雑であること、等の欠点がある。

一方、後者の直接導入法は、植物種に制限がなくしかも操作が簡単であるという要請に近づいた

方法であるという点で、有意義なものである。しかしながら、従来の直接導入法は、必ずしも満足すべきものではなかった。すなわち、植物細胞はそれをプロトプラストの形にしても外来遺伝子の導入が不十分であるので、導入促進剤としてポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリカチオンポリマー等の合成高分子を使用することが必要であるが、そのような手段を講じてもおおむね導入効率が低く、また使用する合成高分子のプロトプラストへの副作用があること、等の問題があったからである。さらに、直接導入法の他の例としてマイクロインジェクション法があるが、この方法にも扱える細胞数が少ないという問題があった。

最近に至って、このような薬品処理によらないで物理的手段で遺伝物質を導入する直接導入法、すなわち電気パルスによる方法、が開発された。この電気パルスによる方法は、プロトプラストに電気パルスを印加することによって、すなわち高い電圧を短時間印加することによって、プロトプラスト表面に一時的に小孔(ポア)を開けて、そこから遺伝物質を導入することからなるものであって、エレクトロポレーションと呼ばれている。電気パルスの印加が装置的にも方法的にも簡便であるので、エレクトロポレーションは工業的簡便導入法としては大いに興味のあるものである。しかしながら、本発明者らの検討したところでは、このようなエレクトロポレーション技術にも問題がある。すなわち、エレクトロポレーション技術の一例はProc.Natl.Acad.Sci.USA 82:5824-5824(1985)に記載のものであって、電気パルスはプロトプラストを等張緩衝液(電解質が溶存している)に懸濁させておいて印加するのであるが、本発明者らがこれを追試したところでは(後記比較例1参照)パルス印加によってプロトプラストが破裂してしまつてその残存率が低く(たとえば50%程度)、またこの残存分を培養しても生存率があまり高くない(たとえば、残存分の70%程度)ので、電気パルスの衝撃に耐えて生存するプロトプラストは極めて低率(上記の例では35

%程度と計算される)であるからである。そして、このような致命的な問題に加えて、遺伝物質の導入率があまり高くない(たとえば、生存分の60%程度)という遺伝子導入手段としては本質的な問題があるのである。

生存率が低いという問題は、電気パルスの衝撃を弱くすることによって解決することができよう。すなわち、電気パルスの印加は、たとえば前記の例では電圧350Vの電気エネルギーを940 μ Fのコンデンサーを介して短時間に放出させることによって行なわれているが、コンデンサーの容量をたとえば100 μ Fにすることによって残存率および生存率がそれぞれ80~90%程度および90%程度にまで向上することを本発明者らは見出している(後記比較例2参照)。

しかしながら、そのような手段を講ずると、遺伝物質導入率が悪化する(たとえば、前記の例での60%程度が40%程度に低下する)ことが判明したのである。

電気パルス印加によるプロトプラストへの遺伝

トロポレーションに付すことによって該遺伝物質を該植物プロトプラスト中に導入する方法において、このエレクトロポレーションを下記の条件に行なうこと、を特徴とするものである。

(イ) 電気パルスの電圧が、パルス印加用電極間の距離1cmにつき250~2500Vであること。

(ロ) コンデンサー容量が、パルス印加用電極の面積1cm²につき0.4~300 μ Fであること。

(ハ) 緩衝液が主要電解質としてKClを15~210mMの濃度で含むものであること。

効 果

本発明によれば、処理されたプロトプラストの残存率/生存率向上を遺伝物質導入率向上との両方が実現可能である。これらの両者が拮抗的関係にあることは前記したところであって、緩衝液中の電解質を比較的多量のKClとすることによってこれらの両者が同時に向上するということが思いがけなかったことというべきである。

物質導入の促進ということが、前記のようにエレクトロポレーションすなわち「電気的な穿孔」に基くものであるとすれば、残存率/生存率と遺伝物質導入率とは拮抗的関係にある誤であるから、低容量コンデンサー使用に際して認められた導入率の低下は首肯しうるものであるし、また従って電気パルスによる衝撃の緩和という方策はエレクトロポレーション技術の前記の問題点を解決する手段としては妥当ではないということにもなる。

(発明の概要)

要 旨

本発明は前記の点に解決を与えることを目的とし、電気パルスによる衝撃を緩和すると共に緩衝液中の電解質を主としてKClとすることによってこの目的を達成しようとするものである。

すなわち、本発明によるエレクトロポレーションによる植物プロトプラストへの遺伝物質の導入法は、植物プロトプラストを遺伝物質と共に等張緩衝液中に分散した状態においてコンデンサーを介して電気パルスを印加することからなるエレクト

ロポレーションによれば、エレクトロポレーション技術固有の利点、すなわち装置的にも方法的にも簡便であること、に加えて、高率で改変プロトプラストを得ることができる。

(発明の具体的な説明)

エレクトロポレーション装置

本発明によるエレクトロポレーションは、前記(イ)~(ハ)の点を除けば、従来公知のエレクトロポレーションと本質的には異なる。本発明と矛盾しない限り、従来提案されるであろうエレクトロポレーションの改良もまた本発明に適用しうることはいうまでもない。

エレクトロポレーションの内容ないし装置は、添付の図に模式的に示した通りである。放電槽にはある距離を置いて対向するある面積の電極が少なくとも一対設けてあって、対向電極間で放電が起るようになっている。エレクトロポレーションを実施する場合には、先ずスイッチを充電側にして「電源」-「コンデンサー」回路が形成されるようにしてコンデンサーに電気エネルギーを貯留さ

せてから、スイッチを放電側にして「コンデンサー」-「放電槽」回路が形成されるようにして、対向電極間に存在するプロトプラスト懸濁液に瞬間的に電流を流しさせる。

このようなエレクトロポレーション装置は、各種の改変が可能であることはいうまでもない。たとえば、コンデンサーを直列または並列に複数個使用して充電-放電間の間隔を短縮すること、放電槽の電極を慣用される典型的な形状である板の代りに棒その他の形状にしたり、放電槽内に複数対設置すること、放電槽を電気的に直列または並列に複数個使用すること、あるいは放電槽内のプロトプラスト懸濁液を攪拌装置によりまたは複数槽間の液の循環によって攪拌すること、その他を必要に応じて実施することができる。

エレクトロポレーション方法

本発明は、上記のようなエレクトロポレーションを、前記した特定の条件(イ)～(ハ)の充足下に実施することからなるものである。

Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)その他であり、等張化剤がたとえばD-マンニトール、D-ソルビトール、ショ糖その他であるものである。pHは5～8程度が好ましい。

緩衝液は緩衝イオンとして1価または2価のイオン、特にアルカリ金属イオンまたはアルカリ土類金属イオン、を含むが、本発明はこのような緩衝イオンの全部または一部が15～210mM、好ましくは20～180mM、の濃度のKClであるということの特徴の一つ(要件(ハ))とするものである。

このような等張緩衝液中のプロトプラストの濃度は任意であるが、 $10^4 \sim 10^7$ 細胞/ml、好ましくは $10^6 \sim 6 \times 10^6$ 細胞/ml、程度であることがふつうである。

遺伝子物質

プロトプラストに導入すべき遺伝子物質は、RNA、DNAおよび植物ウイルス粒子が代表的である。

プロトプラスト懸濁液

対象とするプロトプラストは、各種の植物からのものでありうる。具体的には、たとえば、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、ニンジン、パレイショ、トマト、タバコ、キャベツ、ハクサイ、ダイコン、キウリ、メロン、スイカ、アルファルファ、ベチュニア、ニチニチソウ、チョウセンニンジン、オウレンなどがある。なお、本発明者らが実験に供したのは、タバコ懸濁培養細胞、ニチニチソウ懸濁培養細胞、イネ懸濁培養細胞およびタバコ葉肉細胞である。これらの植物の細胞からのそのプロトプラストを得る手段も慣用のものであって、具体的には、たとえばセルラーゼ、ペクチナーゼ等の細胞壁溶解酵素による処理によればよい。

プロトプラストの分散媒をなす等張緩衝液は、合目的な任意のものでありうる。具体的には、たとえば、バッファーがたとえばMES(すなわち、2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)、リン酸塩、HEPES(すなわち、N-2-

本発明では、ウイルス粒子をも遺伝物質として扱っていることに留意されたい。ウイルス粒子は、外殻タンパクに被覆されていてもその内部にはRNAまたはDNAを持つところから、これを遺伝物質として取扱うことができるばかりでなく、本発明方法によるプロトプラストへの導入が確立されているからである。なお、本発明者らが遺伝物質として実験に使用したものは、タバコモザイクウイルス(TMV)およびキウリモザイクウイルス(CMV)のRNA、クロラムフェニコールアセチル転移酵素またはネオマイシンリン酸転移酵素の構造遺伝子を持つDNA、TMV粒子およびCMV粒子である。

遺伝物質はエレクトロポレーションの際はプロトプラスト懸濁液中に存在する状態で、そのときの濃度はRNAおよびDNAの場合はたとえば $1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $5 \sim 60 \mu\text{g/ml}$ 、ウイルス粒子の場合はたとえば $50 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $100 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ 、であることがふつうである。

電圧／コンデンサー容量

本発明の他の要件は、コンデンサーを介して印加すべき電圧が $250 \sim 2500 \text{ V/cm}$ 、好ましくは $500 \sim 1200 \text{ V/cm}$ 、であること（要件（イ））、ならびにコンデンサー容量が $0.4 \sim 300 \mu\text{F/cm}$ 、好ましくは $20 \sim 60 \mu\text{F/cm}$ 、であること（要件（ロ））、である。ここで、電圧は対向する電極の距離 1 cm についてのそれであり、コンデンサー容量は対向する電極の面積 1 cm^2 当りのそれである。

電極が典型的な板状の外に棒状その他の形状であってもよいことは前記したところであるが、電極の形状がどうあれ、電極の面積（接液部の面積であることはいうまでもない）は対向し合う電極の面積の相加平均を指称するものとする。電極（および放電槽）がどのような形状のものであれ、放電槽内のプロトプラスト粒子のできるだけ多くが電気パルスを受けると配位すべきことはいうまでもない。

質は電気パルス印加時に既にプロトプラストと共存していることが好ましい。上記したところから、遺伝物質共存下に電気パルスの印加を行なったときも、印加後もたとえば10分間程度は懸濁液を放置しておいて遺伝物質のプロトプラストへの導入率を向上させることが好ましい。

エレクトロポレーションの際の温度は、 $0 \sim 35^\circ\text{C}$ 程度がふつうである。温度が高すぎるとプロトプラストの破壊をもたらすからであり、一方低温すぎると凍結によるプロトプラストの破壊がおこるからである。

改変プロトプラストの処理

上記のようにしてエレクトロポレーション処理したプロトプラストは、適当な回路手段によって集め、培養細胞壁の再形成その他の処理を施すなどし、さらに適当な手段によって遺伝物質が導入されたものを選抜して、適宜利用することができる。

実験例実験例1（RNAの導入）

（イ）エレクトロポレーション装置

放電／電気パルスの印加

電気パルスの長さは、本発明で限定する電圧およびコンデンサー容量の下では $0.5 \sim 30$ ミリ秒（ms）、好ましくは $3 \sim 10 \text{ ms}$ 、であることがふつうである。ここで、電気パルスの長さとは、パルスの初期電圧（パルスの初期電圧は、回路の内部抵抗のため、充電電圧より低い）が $1/e$ （ e ：自然対数の底）に落ちるまでの時間（ τE ）を意味する。

エレクトロポレーションは系での被導入物の存在を必須とすることはいうまでもないが、被導入物は必ずしも電気パルス印加時に存在していなくてもよい。何故ならば、電気パルスの印加によって形成された小孔はすぐには閉じないこと、また、事実、たとえば電気パルス印加10分後のプロトプラスト懸濁液にRNAを添加してもプロトプラストの50%にRNAが導入されること、が本発明者らの実験によって確認されているからである。もっとも、電気パルス印加とRNA添加との間が長くなるにつれて導入率が低下するから、遺伝物

実験に供した装置は手製であって、図示の構成のものである。電源は、電気泳動用電源（V-Cスタビライザー、モデル「SJ-1061」、A to h社製）である。図示の構成ではコンデンサーは1個だけであるが、様々な程度の電気放電を得るために、個々にあるいは組合せて使えるように、 1 、 10 、 17 、 100 、 220 および $470 \mu\text{F}$ の容量のコンデンサーを回路に並列に配置した。コンデンサーは、 $47 \mu\text{F}$ のものが日本ケミカルコンデンサー（株）（青州市）製である外は、すべて信栄通信（株）（伊那市）製である。放電槽は、分光光度計に使うポリスチレンまたはガラス製のキューベット（内径 $10 \times 12 \times 5 \text{ mm}$ ）中に 4 mm の間隔をおいて2枚のステンレス網板（ $10 \times 12 \times 0.5 \text{ mm}$ ）を配置したものからなる。電極間の電気放電は、シンクロスコープ（モデルV-155（株）日立製作所製）を使って調べた。

（ロ）プロトプラスト

プロトプラストは、長田らの方法（Hol.Gen.

Genet. 184, 161-165 (1981)) によって、タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2, cell line BY2) 、ニチニチソウ (*Vinca rosea*) およびイネ (*Oryza sativa*) の懸濁培養細胞から調製した。なお、長田らの方法で使用するセルラーゼ・オノスカ・RSの代りに、セルラーゼYC (盛進製薬製) を使用して得たプロトプラストをも使用した。

タバコ葉肉プロトプラストは、長田の方法 (Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol. 17, pp491-507 Springer Verlag 刊) によって、タバコ (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc) から単離した。

(ハ) ウィルスRNA

RNAは、福永らの方法 (Virology, 113, 752-760 (1981)) によって、タバコモザイクウィルス (TMV) およびキウリモザイクウィルス (CMV) の粒子から単離した。

(ニ) エレクトロポレーション

i. (タバコ懸濁培養細胞、TMV-RNA、

同様にエレクトロポレーションを行なった。このときの該プロトプラストの残存率は92%、24時間後の生存率は残存していたものの89% (供試プロトプラストの82%) で、そのうちの85% (同70%) のものがCMVに感染していた。また、このときの電気パルスの長さは $E \leq 6$ ミリ秒であった。

iii. (タバコ懸濁培養細胞、TMV-RNA、リン酸塩-140 mM KClの例)

前記iにおいて、70 mM KClおよび300 mM D-マンニトールを含む5 mM MES緩衝液を、140 mM KClおよび200 mM D-マンニトールを含む10 mM カリウム-カリウムリン酸緩衝液 pH 7.0 に置き換えて、前記iと同様にエレクトロポレーションを行なった。このときの該プロトプラストの残存率は80%、24時間後の生存率は残存していたものの77% (供試プロトプラストの62%) で、そのうちの76% (同47%) のものがTMVに感染していた。

MES-70 mM KClの例)

タバコの懸濁培養細胞のプロトプラストを70 mM KClおよび300 mM D-マンニトールを含む5 mM MES緩衝液、pH 5.8、に 3×10^6 細胞/皿の濃度に懸濁させ、そこへTMVのRNA濃度を40 μ g/皿の濃度となるように添加し、このように調製した供試液の1皿に電圧300 Vで100 μ Fのコンデンサーを用いて1回の電気パルスを与えた。このときの該プロトプラストの残存率は90%、24時間後の生存率は残存していたものの90% (供試プロトプラストの81%) で、生存プロトプラストの87% (同70%) のものがTMVに感染していた。

TMVの感染率は蛍光抗体法 (Virology, 38, 497-499, (1969)) で検定した。またこのときの電気パルスの長さは $E \leq 6$ ミリ秒であった。

ii. (タバコ懸濁培養細胞、CMV-RNA、MES-70 mM KClの例)

前記iにおいて、TMV-RNAを30 μ g/皿濃度のCMV-RNAに置き換えて、前記iと

iv. (タバコ懸濁培養細胞、TMV-RNA、HEPES-70 mM KClの例)

前記iにおいて、70 mM KClおよび300 mM D-マンニトールを含む5 mM MES緩衝液を、70 mM KCl、5 mM $CaCl_2$ および300 mM D-マンニトールを含む5 mM HEPES緩衝液、pH 7.0 に置き換えて、前記iと同様にエレクトロポレーションを行なった。このときの該プロトプラストの残存率は79%、24時間後の生存率は残存していたものの75% (供試プロトプラストの59%) で、そのうちの77% (同46%) のものがTMVに感染していた。

v. (ニチニチソウ懸濁培養細胞、TMV-RNA、MES-70 mM KClの例)

前記iにおいて、タバコ懸濁培養細胞のプロトプラストをニチニチソウ懸濁培養細胞のプロトプラストに置き換え、同様にエレクトロポレーションを行った。この時のプロトプラスト残存率は95%、24時間後の生存率は90% (供試プロ

トプラストの86%)であり、生存プロトプラストの73%(同62%)のものがTMVに感染していた。また、このときの電気パルスの長さは t_E は6ミリ秒であった。

vi. (イネ懸濁培養細胞、CMV-RNA、MES-70mM KClの例)

前記iiにおいて、タバコ懸濁培養細胞のプロトプラストをイネ懸濁培養細胞のプロトプラストに置き換えて、同様にエレクトロポレーションを行った。この時のプロトプラスト残存率は97%で、24時間培養後の生存率は99%(供試プロトプラストの96%)であり、生存プロトプラストの37%(同36%)がCMVに感染していた。

vii. (タバコ葉肉細胞、TMV-RNA、MES-70mM KClの例)

前記iにおいて、タバコ懸濁培養細胞のプロトプラストをタバコ葉肉細胞のプロトプラストに置き換え、電圧200Vで、エレクトロポレーションを行った。この時のプロトプラスト残存率は96%で、24時間後の生存率は97%(供試プ

ロトプラストの93%)であり、生存プロトプラストの44%(同41%)がTMVに感染していた。

比較例-1

タバコの懸濁培養細胞のプロトプラストを10mM KCl、60mM NaClおよび300mM D-マンニトールを含む5mMリン酸緩衝液、pH7.0に 3×10^6 細胞/滅の濃度に懸濁させ、TMVのRNAを40 μ g/滅の濃度となるように添加し、このようにして調製した供試液の1滅に実施例1の装置において電圧350Vで940 μ Fのコンデンサーを用い、1回の電気パルスを与えた。このときの該プロトプラストの残存率は50%、24時間後の生存率は残存していたものの67%(供試プロトプラストの34%)で、そのうちの60%(同20%)のものがTMVに感染していた。また、このときの電気パルスの長さは t_E は18ミリ秒であった。

比較例-2

比較例1において、電圧350V、コンデンサ

ー容量940 μ Fを電圧300V、コンデンサー容量100 μ Fに置き換えて、比較例1と同様にエレクトロポレーションを行なった。このときの該プロトプラストの残存率は80%、24時間後の生存率は残存していたものの70%(供試プロトプラストの56%)で、そのうちの39%(同22%)のものがTMVに感染していた。

実施例2 (DNAの導入)

i. 実施例1の(二)-iのTMV-RNAを10 μ g/滅のDNA-1、またはDNA-2に置き換え、同様にエレクトロポレーションを行った。この時の残存率、生存率は実施例1の(二)-iに同じであった。6~36時間培養した細胞を回収し、細胞と同量の0.25Mトリス緩衝液(pH7.8)を加え、超音波発生装置(トミー社製)で細胞を破壊した。65℃で10分間加熱し16000 \times g/5分間/4℃で遠心し、上清を回収した。

上清40 μ lに、40 μ lの0.25M Tris (pH7.8)、1 μ lの 14 C標識クロ

ラムフェニコール(0.1 μ Ci、50mCi/mmol、NEN社製)を加え、37℃で5分間加熱し、4mMアセチル-CoA 20 μ lを加え、37℃で1時間反応させた。

反応後、500 μ lの酢酸エチルを加え、混和して、反応を止めると同時に 14 C-クロラムフェニコール及び反応生成物である1-アセチル-クロラムフェニコール、3-アセチル-クロラムフェニコール、1,3-ジアセチル-クロラムフェニコールを酢酸エチル層に抽出した。酢酸エチル層を回収、濃縮し、シリカゲルの薄層板上にスポットし、クロロホルム：メタノール(95:5)の溶媒で砂層クロマトグラフィーを行い、溶媒を自然気化後、オートラジオグラフィーを行った。

その結果、リケ糖果由来DNAまたは原核生物内でクロラムフェニコール耐性遺伝子を発現するpBR325 DNAを用いた場合、反応生成物であるアセチル化クロラムフェニコールは得られなかったが、DNA-1、DNA-2を用いた場合はアセチル化クロラムフェニコールを得た。その

時の活性は0.4ユニット酵素と比較して、DNA-1では約50%、DNA-2では90~120%であった。また、この活性は、細胞を10~50 μ g/滅の α -アミニチンまたは、10 μ g/滅のシクロヘキシミド存在下で培養した場合は発現しなかったが、100 μ g/滅のカナマイシン存在下で培養した場合は無処理のものと同じように発現した。

DNA-1は、ノバリン合成酵素のプロモーター下流にクロラムフェニコールアセチル転移酵素の構造遺伝子を継ぎ、さらにその下流にノバリン合成酵素の3'下流配列(poly Aシグナルを含む)を継いだものをプラスミドpBR322にクローン化したものである。DNA-2は、DNA-1の、ノバリン合成酵素のプロモーターをカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターで置き換えたものである。

ii. 実施例1の(ニ)-1のTMV-RNAを10 μ g/滅のDNA-3に置き換えて、同様にエレクトロポレーションを行った。この時の残

存率および生存率は、実施例1の(ニ)-1に同じであった。4~7日間培養細胞を培地で洗い、約10⁴個/滅で0.8%アガロース、10 μ g/滅の抗生物質G418(ジュネティシン、ジフコ社製)を含む長田らの培地(Molecular and General Genetics, 184, 161-163(1981))に埋め込み、培養した。

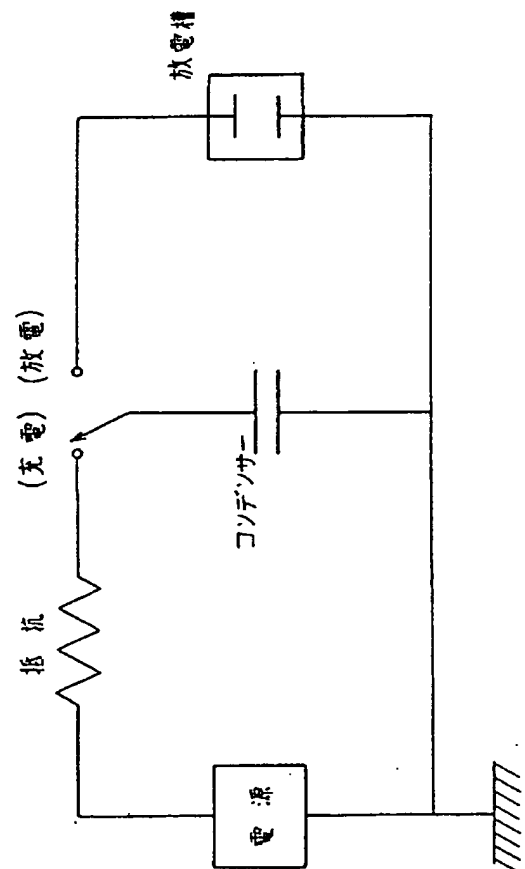
その結果、サケ精巣由来のDNAを用いた細胞群は、この培地上では死滅したが、DNA-3を用いた細胞群よりコロニーを得た。この時の形質転換細胞の出現頻度は、10⁻³~10⁻⁴であった。また、これら形質転換体よりDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーション実験を行ったところ、導入したDNAが細胞DNA中に組み込まれていることを確認した。DNA-3は、DNA-1のクロラムフェニコールアセチル転移酵素の構造遺伝子部分を細菌プラスミド由来のネオマイシンリン酸転移酵素の構造遺伝子で置き換えたものである。

実施例3(ウイルスの導入)

実施例1の(ニ)-iにおいて、TMV-RNAを500 μ g/滅のTMV粒子またはCMV粒子に置き換えて、同様にエレクトロポレーションを行なった。このときの該プロトプラストの残存率、24時間後の生存率は実施例1の(ニ)-iと同じであった。生存プロトプラストのTMV感染率は30%(供試プロトプラストの24%)、CMV感染率は37%(同30%)であった。

4. 図面の簡単な説明

図面はエレクトロポレーション装置を模式的に示し説明図である。



出願人代理人 佐藤 一 郎